

# マイクロマシーニング技術のバイオテクノロジーへの応用に関する研究

—DNA 注入用マイクロキャピラリーアレイの作製—

Fabrication of The Micro-Capillary Array for DNA Injection

全 教 錫\*・橋 口 原\*\*・年 吉 洋\*・藤 田 博 之\*

K.S.CHUN, Gen HASHIGUCHI, Hiroshi TOSHIYOSHI and Hiroyuki FUJITA

## 1. はじめに

近年、半導体集積回路技術を利用して、単結晶シリコン基板上に微細な機構部品を作り、その特質を活かした新しいマイクロシステムを開発しようとするマイクロメカトロニクスの研究が盛んに行なわれている。マイクロメカトロニクスが対象とする構造体は代表寸法が数から数百マイクロにわたるものであり、LSIのような平面的な加工技術に加え3次元的な微細加工技術が要求される。一方、生物学、医学、薬学、生化学、遺伝子工学などを基礎として急速に進歩しつつあるいわゆるバイオテクノロジーの研究と開発は、日進月歩のスピードで進んでおり、組織や細胞レベルでの研究から DNA レベルでの生物機能の解明へと進展している<sup>1,2)</sup>。なかでも、将来バイオテクノロジーの応用面で中核技術と目されている遺伝子組換え DNA 技術は、当初の微生物を対象とした医薬品生産から発展し、農作物、家畜などの高等動植物の改良、食品素材や化学品の生産、遺伝子治療、さらには動物複製 (cloning) など広範多岐にわたった研究開発が進められている<sup>1)</sup>。こういうバイオテクノロジー研究では、細胞、核、染色体、DNA、タンパクなどの生体高分子のハンドリングに対するニーズが多く、また生物の持っている優れた機能を工学的にあるいは産業的に応用しようとする試みも数多くなされている[3]。細胞は1 $\mu\text{m}$ から数十 $\mu\text{m}$ 、細胞内の小器官は約1 $\mu\text{m}$ 以下、DNAは直径2nm、長さ1000塩基対(1kb)あたり3 $\mu\text{m}$ 、タンパクは数十nm以下、といったように、これらはすべてマイクロメータサイズ以下の大きさを持つので、これらの微細な対象を上手に扱うには、対象にあわせた微細なツールが必要となる。数 $\mu\text{m}$ から数百 $\mu\text{m}$ の大きさの機械的構造、電極系などが比較的容易に製作できるマイクロマシ

技術は、このニーズに応えることのできる有力な、そしてほとんど唯一の技術であると思われる。数 $\mu\text{m}$ から数百 $\mu\text{m}$ の大きさの機械的構造、電極系などが比較的容易に製作できるマイクロマシニング技術は、このニーズに応えることのできる有力な、そしてほとんど唯一の技術であると思われる。バイオテクノロジー研究に当っては細胞に遺伝子を注入することから始まるが、現在まで多数の細胞に効率よく遺伝子が注入出来る方法は開発されていないのが現状である。本研究では、マイクロマシニング技術を駆使し、新しい概念に基づく遺伝子導入システムの開発をを目指している。

## 2. 従来の主な遺伝子注入法

### パーティクルガン (particle gun) 法

マイクロブリット (micro bullet) と呼ばれる直径1 $\mu\text{m}$ から数 $\mu\text{m}$ くらいの金属の微粒子に遺伝子物質をコーティングし、パーティクルガンで高速度で細胞や組織に打ち込むことにより遺伝子を導入する方法である<sup>4)</sup>。この方法は以下の短所を持つ。

- ・形質転換植物の作出効率が非常に低い
- ・再現性に乏しい
- ・遺伝子発現の量的解析が容易でない

### エレクトロポレーション (electroporation) 法

高電圧の電気パルスプロトプラスト (細胞壁が除去された細胞を言う) に与えると、細胞膜が時的に破壊される現象を利用して、DNAを導入する方法である<sup>4,5,6)</sup>。細胞の懸濁液に外部より適当な電界を与えると、細胞膜には電界強度に応じた力が加わる。この力が細胞膜の構造を維持する以上に大きくなると、細胞膜は破壊されて膜の透過性が上昇し、細胞膜内外での物質の交換が頻繁になる。細胞膜を破壊するぎりぎりの電界強度を与える電圧を臨界電圧というが、極めて短い時間この臨界電圧を加えると細胞膜

\*東京大学生産技術研究所 第3部

\*\*新日本製鐵(株)半導体基盤研究所

## 研 究 速 報

の部分的破壊が起こる。細胞膜に形成される穴は小さく、細胞膜の自発的修復が可能である。したがって、この条件下では一時的に細胞内外の物質の交換が起こり、細胞外の物質が細胞内に導入される。

- ・プロトプラスト培養系が必要である
- ・培養系がやや煩雑である

## マイクロインジェクション (microinjection) 法

先端部の外径が  $1\ \mu\text{m}$  以下のガラス毛细管から作製した微細キャピラリーや細胞補足用のピペットを用いて、光学顕微鏡下で微細キャピラリーを操作しながら直接細胞に差し込み遺伝子注入を行う方法である<sup>5,7)</sup>。この方法は遺伝子を直接細胞の中に入れるため、他の方式より遺伝子導入確率が高いという長所を持つ。しかしながら、単一キャピラリーによるマイクロインジェクション法は一個の細胞にしか遺伝子導入ができないので作業効率が非常に悪く作業者の熟練が要求される。

上記した遺伝子導入方法以外にも他に幾つかの方法はあるが、いずれの方法を採った場合でも遺伝子導入作業の高効率化の決め手となる方法は未だになく、バイオテクノロジーの研究、開発、応用のそれぞれの段階の進歩に大きな障害となっており、遺伝子導入作業効率や遺伝子導入効率問題が解決できる画期的な遺伝子導入法が強く望まれているのが現状である

## 3. 本研究での遺伝子導入法のコンセプト

従来、細胞に遺伝子を注入する時には、細胞を個別的ではなく集団として扱って注入を行なって来たため、細胞や遺伝子の無駄遣いが多くまた遺伝子導入操作の効率が非常に悪いという問題があった<sup>3,4,5)</sup>。その理由としては、細胞の大きさの問題から細胞を個別的にかつ正確にハンドリングできる操作ツールや操作技術が確立されていなかったこ

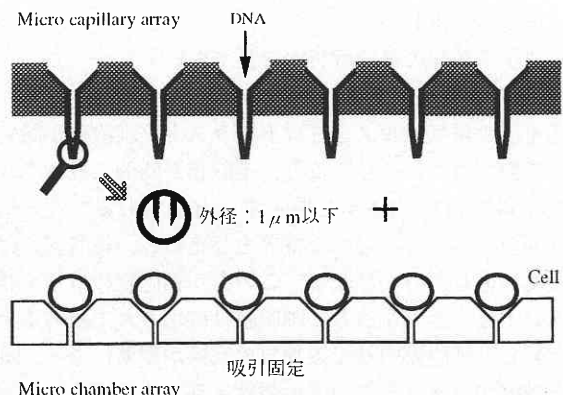


図 1 New Concept for DNA Injection

とが挙げられる。本研究では、マイクロマシンニング技術を駆使し、細胞の個別的な操作と同時に多くの細胞を対象とし遺伝子導入操作の一括処理が可能な遺伝子注入法を開発する。図 1 に本研究で進めている遺伝子注入法の概念図を示す。

本遺伝子注入法では、まずそれぞれのマイクロチャンバーに細胞を一個ずつ入れて置き、キャピラリーアレイを用いて保持されたいるすべての細胞に対して一括に DNA 注入を行なうという考え方である。遺伝子導入機構のアレイ化により多くの細胞を対象とした遺伝子導入操作が可能となり、作業効率や DNA 導入効率を大幅に引き上げられるのである。

< Micro-Capillary array >細胞に遺伝子を注入するツールとして微細キャピラリーを用いる。従来ガラス製の微細針を用いた遺伝子導入法にマイクロインジェクション法があるが、一回に一個の細胞にしか遺伝子導入ができないので遺伝子導入操作の効率が非常に悪いという問題があった [3][5]。本研究では、微細キャピラリーをアレイ化することにより遺伝子導入作業の効率問題をクリアする。

< Micro-Chamber array >遺伝子導入操作の際には対象細胞を特定の場所に逃げないように保持する微細ツールが必要である。シリコンの KOH 異方性エッチングにより作製されるピットをマイクロチャンバーとして利用する<sup>2,7)</sup>。KOH 溶液による単結晶シリコンの異方性エッチングを用いれば簡単にマイクロチャンバーが作られる。現在、マイクロマシンニング分野では、シリコンの異方性エッチングが広く使われているが、(100) Si ウェハの一面から異方性エッチングを施すと、寸法精度の高いピットが形成される。そして、ピットの大きさを細胞の直径より少し小さめに作れば、一個の細胞だけの捕捉が可能となる。細胞捕捉の時は、マイクロチャンバーの上に細胞が入った溶液を流し、そして背後から細胞に陰圧をかけてやると一つのチャンバーに一個の細胞が負圧吸引固定される。また、マイクロチャンバーをアレイ化することにより、多くの細胞を一括にアレイに配列、固定することができる<sup>8)</sup>。

## 4. FIB 加工による微細針の試作

微細針のアレイを作製するには、まずシリコン基板に  $1\ \mu\text{m}$  以下の寸法精度の高い微細穴を深くまた数多く形成する必要がある。この微細穴形成技術が本遺伝子導入システム作製の鍵となる最も重要なプロセスである。今回の微細穴形成には微細針作製プロセスの検証を兼ねて FIB (Focused Ion Beam) 加工を用いて形成した。図 2 に FIB 加工を用いた時の微細針の作製プロセスチャートを示す。

まず、シリコン基板上に直径  $1\ \mu\text{m}$  の微細穴を形成する

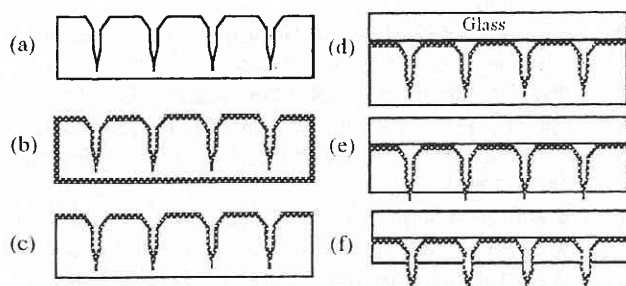


図 2 Process chart for capillary array

(図 a). その後、シリコン基板全面に熱酸化を行う (b). 基板表面をレジストで保護し、基板裏面の酸化膜を除去する (c). そして、ガラスと陽極接合させ (d), 穴の先端部までポリシング (polishing) を行う (e). 最後にシリコン基板の裏面からバックエッチングを行い針を完成する (f). FIB 加工を用いて試作した微細針アレイの SEM 写真を図 3 に示す. 全部で 25 個の微細針が作られている. FIB 加工の際は FIB 加工を用いて試作した微細針アレイの完成図を図 3 に示す. 全部で 25 個の微細針が作られている. FIB 加工の際は、直径  $1 \mu\text{m}$ 、深さ  $30 \mu\text{m}$  の穴を形成するつもりだったが、実際の出来上がった写真からみると針の長さは約  $12 \mu\text{m}$  程度と予想より短かった. 図 4 に示した微細針の拡大図からは針先端部の曲率半径が約  $0.1 \mu\text{m}$  と鋭く尖っているのが分る. 細かい穴の加工が進むにつれてビームや反応ガスが入りにくくなるため針先端部が自然に尖った構造になる. 遺伝子導入用の針の構造としては当然ながら先端部が鋭く尖った方が望ましい. FIB 加工で穴を形成した後は、 $2000 \text{ \AA}$  の熱酸化を行い、そして基板表面をエッチングから保護するためにガラスと陽極接合を行った. 最後にシリコン基板をある程度ポリシングをかけてから TMAH が薄く含まれている有機アルカリ溶液を用いて基板のバックエッチングを行い、針を完成させた. なお、今回は針の作製プロセスの検証が主目的だったので、針の先端部分を開けるプロセスは行わなかった.

図 5 は針の先端部分が切れた写真で、微細針の内部に穴があいているのがと見える. 以上の結果から FIB 加工を用いて遺伝子注入用微細針を作製した時の針の形や微細針の作製プロセスの検証ができた. しかし、FIB 加工では比較的容易に微細穴を形成できるが、穴を一個一個加工しなくてはならないため数千から数万個という針アレイの加工には適していない. そこで、将来的には微細針のアレイを一括して作ることが出来る電気化学的トレンチエッチングプロセスの適用を考えている. また、FIB 加工で作製した針は、シリコン酸化膜からなる針の遺伝子注入時の特性評価に用いる予定である.

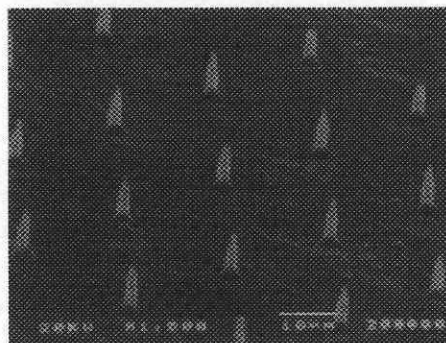


図 3 SEM image of the capillaries

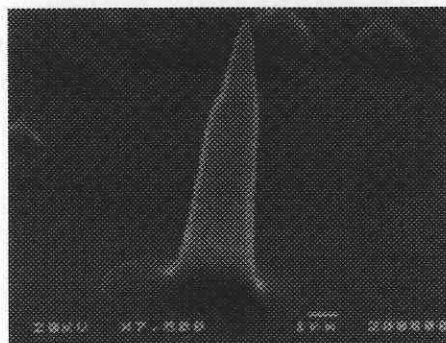


図 4 Close-up view of the capillary

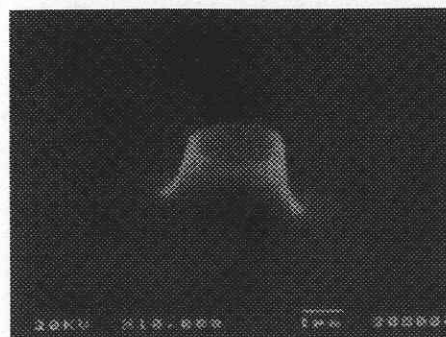


図 5 SEM image of cut-cupillary

## 5. ま と め

本研究を要約すると以下ようになる. マイクロマシンニング技術のバイオテクノロジーへの応用としてバイオテクノロジー研究における中核技術である遺伝子注入に関し、新しい概念に基づいた遺伝子注入法を提案した. 従来の遺伝子注入技術を踏まえ、微細キャピラリーをアレイ構造にし、遺伝子注入効率を大幅に引き上げられる遺伝子注入機構について述べた. 本遺伝子注入法は、直接注入方式であるため、他の方式と比べ遺伝子導入を確実に進めることが期待できる. また、FIB 加工による微細キャピラリーアレイの試作を行い、出来上がった針の構造や針作製プロセス

## 研究速報

の検証を行った。将来的には、微細針アレイを一括して作るプロセスも用いて行く予定である。

## 謝 辞

本研究は農林水産省との共同研究プロジェクトであり、研究を行うに当って農林水産省森林総合研究所傘下、生物機能開発部細胞操作研究室の方々から多大なる研究協力や御助言を頂いた。記して深く謝意を表します。

(1997年12月24日受理)

## 参 考 文 献

- 1) 河村喜雄, 田中伸司, “マイクロメカニカルデバイスを用いた1対1細胞融合技術の開発”, 精密工学会誌, JSPE-56-01, '90-01-86.
- 2) Washizu et al, “*Handling of Biological Cells*”, IEEE Transactions on Industry Appl, Vol. 26, No. 2, March/April, 1990.
- 3) 伊藤 羊, 鈴木隆之, “組換えDNA技術の産業利用の国際的動向”, 化学と生物, Vol. 28, No3, pp. 182-196. 1991.
- 4) 杉村 厚, 清水 伸, “電気芽孔法”, 化学と生物, ”29, 54-60, 1991.
- 5) 松本伯夫, 齊木 博, 末永智一, 内田 勇, “単一細胞を対象としたマイクロエレクトロポレーションの開発”, 電気学会, Vol. 116-E, pp. 184-189. 1996.
- 6) 葛西, 稲葉, “高電圧パルスによる細胞芽孔のメカニズム” 遺伝子導入法の基礎, 蛋白質核酸 酵素, 31, 1591-1603, 1986.
- 7) 野村港二, “マイクロインジェクション” 化学と生物, 29, 811-817, 1991.